



11-13-06

IFJ-

Express Mailing Label No: EV844000641US

PATENT APPLICATION

Docket No: 16785.10

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of: )  
Seth Hallström et al. )  
Serial No.: 10/599,401 ) Art Unit  
Confirmation No.: 8352 ) Unknown  
Filed: September 27, 2006 )  
For: PHARMACEUTICAL COMBINED )  
PREPARATION CONTAINING A THERAPEUTIC )  
PROTEIN )

TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Transmitted herewith is a certified copy of Austrian Patent Application No. A 556/2004 in support of the priority claim for entry in the above-identified application.

Dated this 10 day of November, 2006.

Respectfully submitted,

*R. Burns Israelson*

R. BURNS ISRAELSEN  
Registration No. 42,685  
Customer No. 022913

RBI:rmh  
W:\16785\10\RMH0000001901V001.doc

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

BEST AVAILABLE COPY

Zentrale Dienste  
Verwaltungsstellendirektion



österreichisches  
patentamt

Dresdner Straße 87  
1200 Wien  
Austria

www.patentamt.at

Kanzleigeühr € 29,00  
Schriftengebühr € 104,00

Aktenzeichen A 556/2004

Das Österreichische Patentamt bestätigt, dass

Dipl.-Ing. Dr. Seth Hallström  
in A-1180 Wien, Ferrogasse 48/2 und  
Harald Gasser  
in A-1140 Wien, Mauerbachstraße 4/6,

am 29. März 2004 eine Patentanmeldung betreffend

"Pharmazeutisches Kombinationspräparat enthaltend ein therapeutisches Protein",

überreicht haben und dass die beigeheftete Beschreibung samt Zeichnungen mit der  
ursprünglichen, zugleich mit dieser Patentanmeldung überreichten Beschreibung  
samt Zeichnungen übereinstimmt.

Österreichisches Patentamt  
Wien, am 28. September 2006

Der Präsident:



HRNCIR  
Fachoberinspektor



CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

A 556/2004

(51) Int. Cl.:

Urtext

H 6748

AT PATENTSCHRIFT

(11) Nr.

(Bei der Anmeldung sind nur die eingerahmten Felder auszufüllen - bitte fest umrandete Felder unbedingt ausfüllen!)

(73)	Patentinhaber: <i>Hallström Seth Dipl.-Ing. Dr., A-1180 Wien (AT)</i> <i>Gasser Harald, A-1140 Wien (AT)</i>
(54)	Titel: <i>Pharmazeutisches Kombinationspräparat enthaltend ein therapeutisches Protein</i>
(61)	Zusatz zu Patent Nr.
(66)	Umwandlung von <i>GM</i> /
(62)	gesonderte Anmeldung aus (Teilung): <i>A</i> /
(30)	Priorität(en):
(72)	Erfinder:

(22) (21) Anmeldetag, Aktenzeichen:

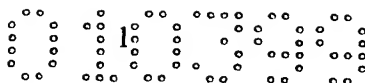
*29. März 2004*  
(60) Abhängigkeit:

(42) Beginn der Patentdauer:

Längste mögliche Dauer:

(45) Ausgabetag:

(56) Entgegenhaltungen, die für die Beurteilung der Patentierbarkeit in Betracht gezogen wurden:



## Pharmazeutisches Kombinationspräparat enthaltend ein therapeutisches Protein

Die vorliegende Erfindung betrifft ein pharmazeutisches Kombinationspräparat, welches ein therapeutisches Protein mit SH-Gruppen enthält, die nitrosiert sind.

Stickoxid (NO) ist ein gasförmiges Molekül, welches unter anderem in Endothelzellen unter normalen physiologischen Bedingungen synthetisiert wird. Die Endothel-abhängige Relaxation von vaskulär glatter Muskulatur ist hauptsächlich auf NO zurückzuführen. Somit ist NO wesentlich für die Regulation des Gefäßtonus. NO ist ferner in einer Reihe von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen involviert. So führt z.B. NO-Mangel im Ischämie/Reperfusion-Geschehen zur Vasokonstriktion und Ödembildung (Huk et al., Circulation 96 (1997), 667-675; Hallström et al., Circulation 105 (2002), 3032-3038).

In Präparationen von Proteinen mit potentiell freien Thiolgruppen liegen nur 20-35% tatsächlich in der freien, reduzierten SH-Form vor. Die übrigen 65 bis 80% sind - insbesondere bei Proteinpräparationen, welche aus Blut abgeleitet sind, oder welche im Rahmen ihres Herstellungsverfahrens mit Plasma oder Plasmaderivaten kontaktiert werden - blockiert, meist durch gemischte S-S Bindungen mit kleinen Thiolgruppen-tragenden Verbindungen, beispielsweise freiem L-Cystein bzw. Glutathion (Katachalski et al., J. Am. Chem. Soc. 79 (1957), 4096-4099; DeMaster et al., Biochemistry 34 (1995), 11494-11499).

Allgemein ist bei den Schwefel-hältigen Gruppierungen in Proteinen grundsätzlich zu unterscheiden zwischen solchen, die in fest gebundener bzw. assoziierter Form, beispielsweise als intramolekulare abgesättigte Disulfid-Bindungen vorliegen und für die Konformation der Proteine entscheidend sind, und jenen, die die potentiell freie(n) Thiolgruppe(n) darstellen. Letztere sind für das jeweilige Protein eine bekannte Größe. Humanes Serumalbumin beispielsweise weist im nativen Zustand eine einzige potentiell freie Thiolgruppe pro Molekül auf, nämlich das Cystein in Position 34. Diese potentiell freien Thiolgruppen neigen jedoch zur Bildung von intermolekularen Disulfiden, weshalb sie auch als gemischte Disulfide bezeichnet werden. Im Plasma liegen bis zu 80% dieser Thiolgruppen als gemischte Disulfide vor und sind also nicht unmittelbar als freie Thiolgruppen verfügbar.

Reaktionen der Sulfhydrylgruppe von niedermolekularen sowie hochmolekularen Thiolverbindungen mit NO, NO<sub>2</sub>, NO<sup>+</sup> oder NO<sup>-</sup> in Gegenwart von Sauerstoff führen zur

Bildung von S-Nitrosoverbindungen, sogenannten S-Nitrosothiolen. S-Nitrosothiole bilden eine Gruppe potenter, bioaktiver Verbindungen, die physiologisch gebildetes NO stabilisieren und dessen biologische Effekte potenzieren. NO wirkt somit in biologischen Systemen nicht nur *per se*, sondern auch über biologisch aktive Redox-Addukte von NO, wie S-Nitrosoproteinen, S-Nitrosoamino-säuren oder anderen S-Nitrosothiolverbindungen.

Die Fachwelt vermutet, dass die *in vivo* Synthese von S-Nitrosothiolverbindungen durch Nitrosierung von endogenen Thiol-enthaltenden Molekülen erfolgt, wie zum Beispiel reduziertes Glutathion, L-Cystein, und Serum Albumin (Stamler et al., PNAS 89 (1992a), 7674-7677; Stamler et al., PNAS 89 (1992b), 444-448). Die reversible S-Nitrosierung dieser Moleküle könnte ein wichtiger zellulär regulatorischer Mechanismus sein. Wesentliche Wirkungen auf biologische Funktionen für einige thiolhaltige Moleküle sind tatsächlich auf die S-Nitrosierungen zurückgeführt worden. So wird unter anderem die protektive Blockierung des N-methyl-D-aspartat-Rezeptors in exitatorischen Neuronen (Lei et al., Neuron 8 (1992), 1087-1099; Lipton et al., Nature 364 (1993), 626-632), Inaktivierung von Proteinkinase C (Gopalakrishna et al., J. Biol. Chem. 268 (1993), 27180-27185) und bestimmte Eigenschaften von Hämoglobin auf S-Nitrosierungen (Stamler et al., Science 276 (1997), 2034-2037; Gow and Stamler, Nature 391 (1998), 169-173) zurückgeführt worden. Jedoch ist der molekulare Mechanismus für die *in vivo* S-Nitrosierung weitgehend unbekannt.

In der Literatur werden derzeit zumindest vier mögliche Mechanismen für die S-Nitrosierung von freien Thiolgruppen-hältigen Verbindungen durch NO diskutiert. Der erste Mechanismus ist ein elektrophiler Angriff einer reaktiven NO-Spezies, das Nitrosoniumkation ( $\text{NO}^+$ ), auf das nucleophile Schwefelatom (Stamler et al., Science 258 (1992d), 1898-1902). Ein zweiter, zwar kontroversiell diskutierter Mechanismus ist, dass S-Nitrosierung durch NO via Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) oder  $\text{NO}_2$  erfolgt (Pryor et al., J. Org. Chem. 47 (1982), 156-159; Mohr et al., FEBS Lett. 348 (1994), 223-227; Wu et al., Am. J. Physiol. 266 (1994), H2108-2113). Der dritte, neuere Mechanismus beschreibt, dass S-Nitrosierungen von Thiolverbindungen (Albumin, reduziertes Glutathion) durch Dinitrosyl-Eisen Komplexe bewirkt wird (Boese et al., J. Biol. Chem. 270 (1995), 29244-29249). Der vierte Mechanismus ist eine S-Transnitrosierungsreaktion oder S-Nitroso-Austauschreaktion, bei denen eine NO-Gruppe von einer S-Nitrosoverbindung auf eine zweite Thiolverbindung im Austausch für eine H-Gruppe übertragen wird (Feelisch et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. 17 (1991), Suppl. 3, S25-S33; Field et al., JCS Chem. Commun. 6 (1978), 249-250). Diese Reaktion erfolgt rasch *in vitro*

und die Bildung von S-Nitrosoglutathion ist unter physiologischen Bedingungen kinetisch wesentlich bevorzugt. (Feelisch et al., (1991); Meyer et al., FEBS Lett. 345 (1994), 177-180; Singh et al., J. Biol. Chem. 271 (1996), 18596-18603; Tsikas et al., Anal. Biochem. 270 (1999), 231-241).

Es wird angenommen, dass S-Transnitrosierungsreaktionen wesentlich für die biologischen Effekte von S-Nitrosoglutathion verantwortlich sind, wobei vermutet wird, dass dieser Prozess weiter zu S-Nitrosierung von thiolhaltigen Proteinen führt (Mohr et al., FEBS Lett. (1994). Es ist gezeigt worden, dass es auch *in vivo* zu S-Transnitrosierungsreaktionen zwischen S-Nitrosoproteinen und niedermolekularen Thiolverbindungen (zB. L-Cystein und N-Acetyl-L-Cystein) kommt (Scharfstein et al., J. Clin. Invest. 94 (1994), 1432-1439). Ein direkter Nachweis (*in vivo*) der Potenzierung der Wirkung, wie zum Beispiel auf den Blutdruckabfall, ist jedoch nicht beschrieben.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die physiologische Wirkung von Proteinen, welche nitrosierte SH-Gruppen enthalten, zu verstärken.

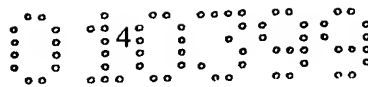
Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein pharmazeutisches Kombinationspräparat gelöst, welches ein therapeutisches Protein mit SH-Gruppen, die nitrosiert sind, und eine Thiolgruppen-hältige Verbindung mit einem mittleren Molekulargewicht von maximal 10.000 enthält. Unter dem Begriff „Thiolgruppen“ werden Sulfhydrylgruppen (-SH) und Disulfidgruppen (-S-S-) verstanden.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Kombinationspräparat besteht darin, dass mindestens 90% der vorhandenen SH-Gruppen nitrosiert sind.

Im erfindungsgemäßen pharmazeutischen Kombinationspräparat ist als therapeutisches Protein mit nitrosierten SH-Gruppen besonders bevorzugt S-Nitroso-Albumin, S-Nitroso-Orosomucoid, S-Nitroso-Plasminogen-Aktivator, S-Nitroso-Fibrinogen, S-Nitroso-Lys-Plasminogen oder S-Nitroso-Hämoglobin enthalten.

Als Thiolgruppen-hältige Verbindung ist besonders bevorzugt reduziert Glutathion, L-Cystein, N-Acetyl-Cystein, L-Cysteinylglycin,  $\gamma$ -Glutamylcystein, Penicillamin, Penicillamid,





N-Acetyl-Penicillamin, N-Acetyl-Penicillamid, Homocystein, Captopril, Dehydroliponsäure und/oder deren oxidierte Form, die nach Verabreichung in vivo reduziert wird, enthalten.

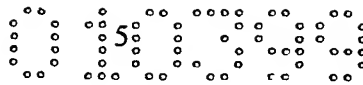
Es hat sich gezeigt, dass eine weitere bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen pharmazeutischen Kombinationspräparates als therapeutisches Protein mit nitrosierten SH-Gruppen S-Nitroso-Albumin und als Thiolgruppen-hältige Verbindung reduziertes Glutathion enthält.

Ferner ist als Thiogruppen-hältige Verbindung ein in menschlichem Blut und Gewebe vorkommende Verbindung, insbesondere reduziertes Glutathion, L-Cystein, L-Cysteinylglycin,  $\gamma$ -Glutamylcystein oder Dehydroliponsäure besonders bevorzugt.

Eine weitere Ausführungsform des erfindungsgemäßen pharmazeutischen Kombinationspräparat besteht darin, daß ein durch Nitrosierung erhaltenes therapeutisches Protein enthalten ist, bei welchem sich der Nitrosierungsgrad zu mindestens 90% aus S-Nitrosierung und zu maximal 10% aus N,O,C-Nitrosierung zusammensetzt.

Prinzipiell kann die erfindungsgemäße pharmazeutische Präparation für die Proteinkomponente jegliche Proteine mit einer „freien“ Thiolgruppe enthalten, bevorzugt sind aber für die Zwecke der vorliegenden Erfindung therapeutisch einsetzbare Proteine, wobei physiologische bzw. aus Blut abgeleitete humane Proteine, wie Albumin, Orosomucoid, Plasminogen-Aktivator (z.B. t-PA), Fibrinogen, Lys-Plasminogen oder Hämoglobin oder auch Mischungen derartiger erfindungsgemäß nitrosierbarer bzw. nitrosierter Proteine, als besonders bevorzugt anzusehen sind.

Demgemäß kann die erfindungsgemäße pharmazeutische Präparation für die niedermolekulare Thiolkomponente jegliche niedermolekulare Thiolverbindung enthalten, wie reduziertes Glutathion, L-Cystein, N-Acetyl-L-Cystein, L-Cysteinylglycin,  $\gamma$ -Glutamylcystein, Penicillamin bzw. -amide, N-Acetyl-Penicillamin bzw. -amide, Homocystein, Captopril (D-2-methyl-3-mercaptopropanoyl-L-prolin) und reduzierte Thioctsäure (Dehydroliponsäure), bevorzugt sind aber im Blut (Plasma) vorkommende niedermolekulare Thiolverbindungen wie z.B. reduziertes Glutathion, L-Cystein, L-Cysteinylglycin,  $\gamma$ -Glutamylcystein und Dehydroliponsäure.

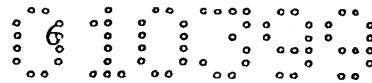


Die Herstellung von nitrosierte Thiolgruppen hältigen Proteinen ist z.B. in der EP-A 0 853 944 beschrieben.

Bevorzugt wird die Nitrosierung so ausgeführt, dass lediglich die frei verfügbaren Thiolgruppen nitrosiert werden und Fremdnitrosierungen vermieden werden (äquimolare Nitrosierung). Dies gelingt, da primär bevorzugt freie SH-Gruppen nitrosiert werden und erst bei Überschuß an Nitrosierungsmittels Fremdnitrosierungen an N,O,C-Atomen der Proteine erfolgen. Beispielsweise stehen N- und C- Nitrosoverbindungen in Verdacht, krebserregend zu sein, und weisen auch eine andere Abgabekinetik der NO-Gruppe auf als S-Nitrosoverbindungen (siehe Zhang et al., J. Biol. Chem. 271 (24) (1996), 14271-14279), weshalb in einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Präparation ein N,O,C-Nitrosierungsgrad der Proteine in der Präparation von maximal 10% vorgesehen wird.

Obgleich es für die Proteinkomponente möglich ist, auch rohe Fraktionen, wie Plasma oder frühe Plasmafraktionen bzw. Kulturflüssigkeiten der equimolaren Nitrosierung zu unterwerfen, werden die Proteine bevorzugterweise in gereinigter Form zur Verfügung gestellt. Der Reinheitsgrad sollte vorzugsweise geeignet sein, dass die Proteine pharmazeutisch verabreicht werden können. Daher wird für die Proteinkomponente der erfindungsgemäßen Präparation ein Protein zur Nitrosierung mit einem Reinheitsgrad von zumindest 80%, insbesondere von zumindest 90% (Gew/Gew%), bezogen auf Protein, zur Verfügung gestellt. Höhere Werte sind natürlich ebenfalls bevorzugt. Dieses gereinigte Protein kann natürlich mit weiteren Proteinen zu einer pharmazeutischen Präparation formuliert werden.

Die Proteinkomponente in der erfindungsgemäßen Präparation kann also eine Mischung verschiedener equimolar nitrosierter Proteine, sie kann aber auch eine Mischung aus einem nicht nitrosierten und einem equimolar nitrosierten Protein darstellen. Bevorzugterweise enthält die pharmazeutische Präparation S-Nitroso Human Serum Albumin als Proteinkomponente und reduziertes Glutathion. Für eine Mischform der Proteinkomponente enthält die pharmazeutische Präparation bevorzugterweise S-Nitroso Human Serum Albumin und Hämoglobin. Für die erfindungsgemäße Präparation wird die Proteinkomponente vorzugsweise in einer höheren Reinheit zur Verfügung gestellt, als die nicht nitrosierte Proteinkomponente. So wird beispielsweise Humanes Serum Albumin oft in einer Reinheit von mindestens 80% an Gesamtprotein als pharmazeutische Präparation verabreicht. Ein



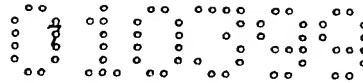
analoger oder höherer Grad der Reinheit ist auch für das S-nitrosierte Protein in der Präparation bevorzugt. Daher wird nach der Nitrosierung der Proteinkomponente für das nitrosierte Protein noch ein zusätzlicher Reinigungsschritt nachgeschaltet.

Im erfindungsgemäßen Kombinationspräparat werden die niedermolekularen Thiolverbindungen bevorzugterweise in gereinigter Form zur Verfügung gestellt. Der Reinheitsgrad sollte vorzugsweise geeignet sein, dass die niedermolekulare Thiolverbindung in der Präparation pharmazeutisch verabreicht werden kann. Daher wird für die niedermolekulare Thiolverbindung der erfindungsgemäßen Präparation ein Reinheitsgrad von zumindest 90%, insbesondere von zumindest 95% Gew/Gew%, bezogen auf die niedermolekulare Thiolverbindung zur Verfügung gestellt. Höhere Werte sind natürlich ebenfalls bevorzugt.

Die erfindungsgemäße pharmazeutische Präparation ist vorzugsweise in einer pharmazeutisch akzeptablen Pufferlösung formuliert, gegebenenfalls mit pharmazeutisch akzeptablen Stabilisatoren. Beispielsweise wird als Stabilisator Natriumcaprylat und/oder Natriumacetyltryptophanat verwendet. In der Regel wird man dabei auf Formulierungen, wie sie für den Einsatz der Proteinkomponente als nicht nitrosiertes Produkt angewendet werden, zurückgreifen können. Die Präparationen können auch als Spray oder in einer für die topische Anwendung geeigneten Form zur Verfügung gestellt werden. Insbesondere wird die Präparation in einer für die intravenöse Verabreichung geeigneten Form zur Verfügung gestellt. Bezüglich der Proteinkomponente zeichnet sich eine i.v.-verträgliche Präparation insbesondere durch einen niedrigen Aggregatgehalt aus bzw. ist frei von Aggregaten.

Selbstverständlich müssen auch für die Lagerung der erfindungsgemäßen Präparation oft Vorkehrungen getroffen werden, sodass diese Präparation über einen längeren Zeitraum stabil bleiben. Die erfindungsgemäße Präparation liegt daher zu Lagerzwecken vorzugsweise in gefrorener oder lyophilisierter Form vor, in welcher sie eine ausreichend lange Haltbarkeit aufweist. Dabei ist sowohl eine Lagerung der niedermolekularen Thiolverbindung und des nitrosierten Proteins der erfindungsgemäßen Präparation in gemeinsamer als auch getrennter Form möglich.

Es hat sich gezeigt, dass beispielsweise für die aus Plasma oder Blut abgeleiteten Proteine, insbesondere für Albumin oder Hämoglobin, die Stabilität in Lösung bei einem pH-Wert



zwischen ungefähr 6 und 7 in einem geeigneten Puffersystem (z.B. Ringerlösung) am größten ist. Für die niedermolekularen Thiolverbindungen, insbesondere für reduziertes Glutathion und L-Cystein, hat sich andererseits gezeigt, dass die Stabilität in Lösung unter einem pH-Wert von 7 am größten ist.

Die pharmazeutische Präparation auf Basis eines Proteins mit nitrosierten Thiolgruppen und einer niedermolekularen Thiolverbindung ist, im lyophilisiertem Zustand getrennt gelagert, stabil.

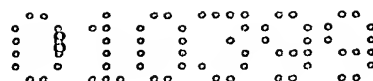
Die Nitrosierung kann im Unterschied zum bekannten Verfahren (z.B.: Stamler et al., (1992a) bevorzugt so durchgeführt werden, dass ausschließlich nach Bestimmung des „freien“ Thiolgehaltes der Proteine equimolar zu diesem Anteil an „freien“ Thiolgruppen nitrosiert wird und gleichzeitig eine niedermolekulare Thiolverbindung bereitgestellt wird. Dabei kommen als Proteinkomponente sowohl native thiolhaltige Proteine als auch thiolhaltige Proteine, bei denen die „freien“ Thiolgruppen durch einen spezifisches Verfahren de-blockiert werden, in Betracht.

Die Abtrennung der Reaktionsmittel bzw. der Reaktionsprodukte erfolgt nach der Nitrosierungsreaktion und vorzugsweise in einem quantitativen Ausmaß bzw. bis zu einem Wert unter der Nachweisgrenze.

Die erfindungsgemäße Präparation zeichnet sich in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform auch durch einen niedrigen Aggregatgehalt der Proteinkomponente aus. Insbesondere liegt der Anteil an Aggregaten in der pharmazeutischen Präparation unter 20%, bevorzugterweise unter 10%, am meisten bevorzugt unter 5%.

Die Nitrosierung der thiolhaltigen Proteine wird unter aeroben Bedingungen vorgenommen, insbesondere wenn mit saurem Natriumnitrit gearbeitet wird.

Die Nitrosierung wird vorzugsweise mit einem Agens, ausgewählt aus  $\text{HNO}_2$ ,  $\text{HNO}$ ,  $\text{NOCl}$ ,  $\text{NO}^+$ ,  $\text{RNO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}_4$ ,  $\text{NO}_2^-$  und  $\text{NO}$ -Radikal, und in einem sauren Medium durchgeführt. Auch organische  $\text{NO}$ -Donoren können eingesetzt werden.



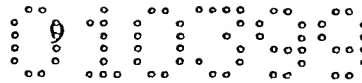
Um den Grad der N- und C-Nitrosierung möglichst gering zu halten, sollte die Nitrosierung mit einem Agens bezogen auf Freisetzung von NO equimolar zum „freien“ Thiolgruppen-Gehalt des Proteins vorgenommen werden. Natürlich kann auch ein kleineres Verhältnis an Agens für die Nitrosierung bezogen auf den Thiolgruppen-Gehalt des Proteins zugesetzt werden, bevorzugt ist aber ein Verhältnis von 1:1. Da die S-Nitrosierung bevorzugt und wesentlich schneller als die N- und C-Nitrosierungen abläuft, ist durch eine equimolare Nitrosierung ein minimaler N- und C-Nitrosierungsgrad des Proteins garantiert. Auch sollte die Zeitdauer der Nitrosierung möglichst knapp bemessen werden. Bevorzugterweise wird daher die Nitrosierung während einer Zeitdauer von 2 Minuten bis mehreren Stunden, vorzugsweise 30 Minuten, bei einer Temperatur zwischen 15-30 °C, vorzugsweise bei Raumtemperatur in einer wässrigen Lösung bei pH 0,3 bis 3,5, am meisten bevorzugt bei pH 1,0 bis 3,0 vorzugsweise im sauren Bereich bis pH 1,5 durchgeführt.

Als Ausgangsmaterial für die Proteinkomponente können sämtliche Arten von Proteinfractionen verwendet werden, also insbesondere auch Blut, Plasma, Serum, eine Plasmafraction oder eine gereinigte Proteinfraction, aber auch Kulturüberstände oder entsprechende Extrakte. Falls jedoch Substanzen im Ausgangsmaterial enthalten sind, welche den Nitrosierungsschritt negativ beeinträchtigen können, wie beispielsweise niedermolekulare Thiolgruppen-hältige Proteine oder Thiolgruppen-hältige Verbindungen, sollten diese vorzugsweise abgetrennt werden. Bevorzugte Plasmafractionen sind solche nach der Cohn Fractionierung und insbesondere die Cohn II- und III-Fraction oder die Cohn IV-Fraction.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens können für die Proteinkomponente auch eine ganze Reihe weiterer Reinigungsschritte in beliebigen Punkten des Verfahrens vorgesehen werden.

Ein weiterer Reinigungsschritt, ausgewählt aus Fällung, Gelfiltration, Diafiltration, Ultrafiltration und chromatographische Reinigung, kann vorgesehen werden. Beispielsweise wird Albumin mittels einer Ionenaustauschchromatographie gereinigt.

Insbesondere kann vorgesehen werden, dass ein Reinigungsschritt nach der Nitrosierung des Proteins durchgeführt wird, so dass sich die dort eingesetzten Substanzen nicht gegenseitig beeinflussen und auch nicht in der fertigen nitrosierten Proteinkomponente vorhanden sind.



Vorzugsweise wird dieser Reinigungsschritt in Form einer chromatographischen Reinigung, insbesondere mittels Gelpermeationschromatographie, durchgeführt

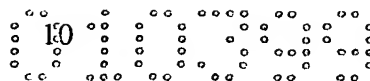
Eine Behandlung zur Inaktivierung von Viren wird vorzugsweise bereits vor der Nitrosierung durchgeführt, sie kann aber auch terminal, also anschließend an die Nitrosierung, vorgenommen werden.

Nach der Nitrosierung kann die Proteinkomponente des erfindungsgemäßen Kombinationspräparates in an sich bekannter Weise zu einem pharmazeutischen Präparat aufgearbeitet werden. Für die Proteinkomponente hält man sich in der Regel an die Formulierungsvorschriften (siehe Pharmakopöe) für die nicht-nitrosierte Proteinpräparation.

Die niedermolekulare Thiolverbindung, bevorzugt reduziertes Glutathion oder L-Cystein, wird in einer pharmazeutisch verabreichbaren Form als Reinsubstanz bereitgestellt und mit der gereinigten, nitrosierten Proteinkomponente simultan i.v. appliziert.

Bevorzugte medizinische Verwendungen dieses erfindungsgemäßen Kombinationspräparates umfassen die Herstellung einer Kombinationspräparation zur Verbesserung der Perfusion bzw. Mikrozirkulation, vorzugsweise in vitalen Organen wie z.B. im Gehirn (zerebrale Ischämie, ischämischen Insult), im Herz (Myokardinfarkt), in der Niere oder in den Extremitäten bzw. im Gesamtorganismus. Damit kann die erfindungsgemäße Kombinationspräparation allgemein zur Verhinderung bzw. Behandlung von Ischämie- und Reperfusionsschäden eingesetzt werden. Die erfindungsgemäße Kombinationspräparation ist auch zur Behandlung von Schock, insbesondere traumatischem, hypovolämischem bzw. hämorrhagischem oder neurogenem Schock geeignet.

Die Kombinationspräparation gemäß der vorliegenden Erfindung kann auf verschiedenen chirurgischen Gebieten verwendet werden, beispielsweise in der Transplantationschirurgie und bei allen chirurgischen Eingriffen mit nachfolgender Reperfusion. Sie ist besonders zur Behandlung und/oder Prophylaxe einer Restenose nach Angioplastie geeignet.



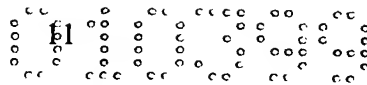
Die Kombinationspräparation kann auch zur Behandlung und/oder Prophylaxe thrombotischer Zustände verwendet werden, d.h. solcher, die mit einer Blutplättchenadhäsion/-aggregation verbunden sind. Bei einer bevorzugten Ausführungsform kann der S-NO-Gewebsplasminogen-Aktivator als thrombolytisches Mittel verwendet werden.

Die Kombinationspräparation ist weiters zur Relaxierung der nicht-vaskulären, glatten Muskulatur, wie z.B. der glatten Muskulatur der Luftwege, verwendbar. Daher kann die Präparation gemäß der vorliegenden Erfindung zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Atemwegserkrankungen verwendet werden. Sie kann auch zur Diagnose und/oder Behandlung von Erektionsstörungen des Mannes nützlich sein.

Eine weitere, wesentlich bevorzugte, medizinische Verwendung des erfindungsgemäßen Kombinationspräparates umfasst die Herstellung einer Kombinationspräparation zur kontrollierten Reduktion des Blutdruckes, wie z.B. bei hypertonen Krisen (d.h. chronische bzw. akute Bluthochdruckkrisen). Dabei wird in der Regel eine höhere Dosierung eingesetzt werden, als zur Verhinderung bzw. Behandlung von Ischämie- und Reperfusionsschäden.

Die medizinische Kombinationspräparation wird vorzugsweise bezüglich der Proteinkomponente in einer Dosis bereitgestellt, die, außer bei Albumin, jener des nicht-nitrosierten Proteins entspricht. Bei Albumin als Proteinkomponente ist die Dosis vor allem von der medizinischen Indikation abhängig. Bei der Verhinderung bzw. Behandlung von Ischämie- und Reperfusionsschäden wird, je nach S-Nitrosograd des Albuminpräparates, eine Dosierung von 0,035-1,0  $\mu\text{mol/kg/h}$  empfohlen. Bei der Reduktion des Blutdruckes sind höhere Dosierungen anzuwenden (z.B. bis zu 10  $\mu\text{mol/kg/h}$  von S-NO-Albumin mit einem S-Nitrosierungsgrad von  $\sim 26\%$ ). Für die niedermolekulare Thiolverbindung (z.B. reduziertes Glutathion) wird eine Dosis von 12-140  $\mu\text{mol/kg/h}$  empfohlen. Die zu verabreichende Menge bzw. Dosis hängt von den Anforderungen des Patienten ab, beispielsweise von Parametern wie Hämatokrit, Oxygenierung, mittlerer arterieller und venöser Blutdruck bzw. pulmonal arterieller Druck, und kann von Fall zu Fall recht unterschiedlich sein. Für die Plättchenadhäsions/aggregationshemmende Wirkung können auch wesentlich geringere Dosierungen eingesetzt werden.

Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Kombinationspräparates ist, dass mindestens der gleiche Wirkungsgrad mit Thiolgruppen-hältigen Proteinen erzielt wird, als mit



Monopräparationen von Thiolgruppen-hältigen Proteinen, bei denen die frei verfügbare Thiolgruppe durch reduktive Vorbehandlung auf 90% freie SH-Gruppen pro Mol Protein erhöht wurde. Verfahrenstechnisch wird dabei die reduktive Vorbehandlung vermieden. Eine equimolare Nitrosierung zur frei verfügbaren Thiolgruppe garantiert den gleichen Reinheitsgrad der Wirkkomponente der Proteinpräparation (N-, C-, O-Nitrosierung <5%). Sowohl Albumin (4-5 g/dL Plasma) als auch reduziertes L-Glutathion (< 5 µmol/L) sind natürlich vorkommende Plasmakomponenten. Eine Limitierung der natürlich auftretenden Transnitrosierungsreaktion ist durch den physiologisch vorkommenden reduzierten L-Glutathionspiegel im Plasma gegeben. Durch Bereitstellung von reduziertem L-Glutathion ist die Freisetzung der Wirksubstanz NO der S-Nitrosierten Proteinkomponente sogar dosisabhängig vom reduzierten L-Glutathion steuerbar.

Selbstverständlich können allgemein bezüglich der Proteinkomponente die erfindungsgemäße Kombinationspräparation auch für jegliche Indikation der nicht-nitrosierten Proteine verwendet werden, da ihre physiologische Wirkung trotz Nitrosierung erhalten bleibt. Zusätzlich jedoch stellen Zustände, welche das Zurverfügungstellen eines erhöhten NO-Gehaltes erfordern, bevorzugte Indikationen für die erfindungsgemäßen Kombinationspräparate dar.

Herstellung von equimolar zur frei verfügbaren Thiolgruppe nitrosiertem Human Serum Albumin und Bereitstellung von reduziertem Glutathion:

a) Bestimmung des Verhältnisses von freien SH-Gruppen pro Mol Protein vor der Nitrosierung.

Das Verhältnis von freien SH-Gruppen pro Mol Protein wurde mittels des Ellmanreagens (Ellman G.L., Arch. Biochem. Biophys. 82 (1959), 70-77) nach Sedlak and Lindsay, Anal. Biochem. 25 (1968), 192-205, bestimmt.

So ist für Human Albumin 20% (Hersteller: Baxter) ein SH-Gruppengehalt von 26% (mol/mol, SH-Gruppengehalt zu Protein) festgestellt worden. Nach reduktiver Vorbehandlung einer weiteren Human Albumin Präparation (AT 405 135; US 6 124 255 und US 6 358 918) sind Werte bis zu 95% erreichbar und nachweisbar.



b) Equimolare Nitrosierung zum freien SH-Gruppengehalt der jeweiligen Human Albumin Präparation

Die Nitrosierung der Albuminpräparationen erfolgte equimolar zum Gehalt der freien SH-Gruppen (Verhältnis:1:1 bis maximal 1:1,2 molar zum ermittelten Wert) mit  $\text{NaNO}_2$  in 0,2 mol/L HCl bei pH 1,5-2,5 für eine Zeitdauer von 15-30 min bei Raumtemperatur.

Anschließend wurde mit 1 mol/L NaOH neutralisiert. Zur Abtrennung unerwünschter Reaktanten wurde eine präparative Gelpermeationschromatographie, unter Verwendung einer stationären Phase aus Perlen mit einem heteroporösen, gequollenen Netzwerk eines Toyopearl TSK HW 40 (F) Gels, durchgeführt. Die Elution erfolgte mit bidestilliertem Wasser bei 4°C. Anschließend wurde die gereinigte S-Nitroso-Albumin enthaltende Fraktion (S-NO-Albumin/Albumin) lyophilisiert.

---

S-Nitrosogradbestimmung der Proteinfraction mit HPLC unter Verwendung der Saville- und Griess Reaktion

Die Analyse kann vor oder nach der Reinigung mittels präparativer Gelpermeationschromatographie erfolgen. Bei dieser Methode werden, falls vorhanden, überschüssiges Nitrosierungsgens und Puffersubstanzen mittels einer Gelpermeationssäule (Toyopearl TSK HW-40-S) vom S-NO-Albumin/Albumin getrennt. Anschließend erfolgt in einem Nachsäulenderivatisierungsverfahren mittels der Saville-Reaktion (Saville B., Analyst 83 (1958), 670-672) eine selektive Abspaltung der NO-Gruppe vom RS-NO durch  $\text{Hg}^{2+}$ .

Simultan wird das entstandene Nitrit durch eine Farbreaktion (Griess-Reaktion; Griess, Ber.Dtsch. Chem. Ges. 12 (1897), 426-428) photometrisch bei 541 nm detektiert.

Die Chromatogramme (Fig. 4) zeigen equimolar nitrosierte S-NO-HSA Präparationen mit unterschiedlichem S-Nitrosograd: a) equimolar zur freien SH-Gruppe nitrosiertes Human Albumin mit einem freien SH-Gruppen Anteil pro mol Protein von 26%; b) equimolar zur freien SH-Gruppe nitrosiertes Human Albumin, welches durch reduktive Vorbehandlung einen freien SH-Gruppen Anteil pro Mol Protein von 74 % aufwies; c) analog zu b) nur erfolgte die Nitrosierung nicht equimolar sondern mit einem 6-fachen molaren Überschuss an Nitrosierungsgens.

Die angeführten Prozentsätze sind nach dem Saville-Prinzip die tatsächlichen S-Nitrosierungsgrade am Protein. Bei der Bestimmung des S-Nitrosierungsgrades vor der

# Beispiel

präparativen Reinigung resultiert ein möglicher zweiter Peak im Chromatogramm vom überschüssigen Nitrosierungsagens (Chromatogramm c). Bei equimolar zur freien SH-Gruppe nitrosierte Albuminpräparationen ist Nitrit nur in Spuren nachweisbar.

## Bereitstellung von reduziertem Glutathion

Als niedermolekulare Thiolverbindung wurde durch Peptidsynthese hergestelltes reduziertes Glutathion mit einem Reinheitsgrad von mindestens 95% zur Verfügung gestellt.

Die Wirkung des erfindungsgemäßen Kombinationspräparates wird nachfolgend an einer bevorzugten Ausführungsform beschrieben.

## Beispiel 1

Im Beispiel 1 wird am Kaninchenmodell die Absenkung des mittleren arteriellen Druckes durch Applikation eines erfindungsgemäßen Kombinationspräparates bestehend aus einer nitrosierten Serum-Albumin-Präparation und reduziertem Glutathion gezeigt. Zum Vergleich wird die Wirkung einer nitrosierten Serum-Albumin-Präparation gezeigt, die ohne reduziertem Glutathion appliziert wurde.

Das Kaninchen wurde anästhesiert, wobei die Anästhesie mit Ketaset (50 mg/kg; bolus) und Xylasin (5mg/kg; bolus) eingeleitet und mit einer kontinuierlichen Infusion via die Vena auricularis von Ketaset (35 mg/kg/h) und 5 mg Xylasin (5 mg/kg/h) gelöst in physiologischer Kochsalzlösung (5 mL/h) aufrechterhalten. Nach der Tracheotomie und Intubation wurden die Kaninchen an das Beatmungsgerät (Ventilator Harvard Apparatus- INSPIRA ASV) angeschlossen ( $\text{Tidal volume} = 0,0062 \times \text{Körpergewicht (kg)}^{1,01}$ ,  $\text{Respirationsrate} = 53,5 \times \text{Körpergewicht (kg)}^{-0,26}$ ).

Der mittlere arterielle Druck (MAP) wurde mittels eines Drucktransducers in der Arterie femoralis gemessen (Verstärkereinheit - TAM-A und Isotec Drucktransducer; Hugo Sachs Elektronik). Die Ergebnisse sind in den Figuren 1a-f dargestellt.

Die Fig. 1a zeigt den Dosis-abhängigen Vergleich der Absenkung des mittleren arteriellen Druckes (MAP) in den Kaninchen nach Bolusgaben von nitrosiertem Serum Albumin mit und ohne gleichzeitige kontinuierliche Infusion von reduziertem Glutathion ( $2,2 \mu\text{mol/kg/min}$ ). Infusion: Vena femoralis ( $n = 3$  per Datenpunkt; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

Die Fig. 1b ist ein repräsentatives Beispiel der Absenkung des mittleren arteriellen Druckes bei einer Bolusinfusion von  $0,1 \mu\text{mol/kg}$  S-NO-HSA mit und ohne kontinuierliche Infusion von reduziertem Glutathion ( $2,2 \mu\text{mol/kg/min}$ ).

Die Figuren 1c und 1d zeigen die Absenkung des mittleren arteriellen Druckes bei zwei verschiedenen Dosen einer nitrosierten Serum Albumin Präparation mit hohem Nitrosierungsgrad (70%) und einem equimolar zur frei verfügbaren Thiolgruppe nitrosierten nativen Serum Albumin mit niedrigem Nitrosierungsgrad (26%) mit gleichzeitiger Infusion von reduziertem Glutathion ( $n = 3$  per Datenpunkt; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

Die Figur 1e ist ein repräsentatives Beispiel der Absenkung des mittleren arteriellen Druckes durch Bolusinjektionen von  $0,1 \mu\text{mol/kg}$  S-NO-HSA mit variablen Konzentrationen von GSH *in vivo*. Infusion: Vena femoralis.

Die Figur 1f ist ein repräsentatives Beispiel der Absenkung des mittleren arteriellen Druckes durch simultane, kontinuierliche Infusion von  $0,05 \mu\text{mol/kg/min}$  S-NO-HSA mit steigender Konzentration von reduziertem Glutathion (a:  $0,0 \mu\text{mol GSH/kg/min}$ , b:  $0,1 \mu\text{mol GSH/kg/min}$ , c:  $0,3 \mu\text{mol GSH/kg/min}$ ). S-NO-HSA wurde über die Vena jugularis und reduziertes Glutathion über die zweite Vena auricularis (oder Vena femoralis) infundiert.

## Beispiel 2

Im Beispiel 2 wird die Potenzierung der NO-Freisetzung einer nitrosierten Serum Albumin Präparation durch Bereitstellung einer niedermolekularen Thiolverbindung am Beispiel von reduziertem Glutathion gezeigt. Die NO-Konzentration wurde *in vitro* gemessen.

Die Figur 2a zeigt die konzentrationsabhängige Potenzierung der NO-Freisetzung einer nitrosierten Serum Albumin Präparation durch reduziertes Glutathion, gemessen mit einem

porphyrinischen Mikrosensor *in vitro* (S-NO-HSA: 30  $\mu\text{mol/L}$ ;  $n=6$ , Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung;  $*P < 0,05$  vs S-NO-HSA;  $^{\#}P < 0,05$  vs 25  $\mu\text{mol/L}$  GSH).

Die Figur 2b zeigt ein repräsentatives Beispiel der *in vitro* Messung der Potenzierung der NO-Freisetzung einer nitrosierten Serum Albumin Präparation durch reduziertes Glutathion.

### Beispiel 3

Mit dem Beispiel 3 wird die Wirkung einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Kombinationspräparates auf die Thrombozyten-Aggregation gezeigt.

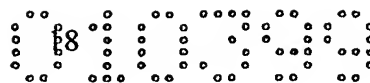
Die Thrombozyten-Aggregation wurde mit humanem Thrombozyten-reichen Plasma (TRP) in einem Dual Kanal Chronolog Aggregometer in Prinzip nach der Methode von Born (1969) durchgeführt. Zu Beginn jedes Experimentes wurde die exakte Dosis an Kollagen, für die durch Kollagen induzierte Aggregation ( $\sim 1\mu\text{g}$  Kollagen/mL TRP ) bestimmt (95-100% Inhibition der Kollagen induzierten Aggregation durch 300  $\mu\text{mol/L}$  Acetylsalicylsäure). In den Experimenten wurden steigende Konzentrationen reduziertes Glutathion primär mit TRP eine Minute im Aggregometer vorinkubiert und nach einer Minute S-NO-HSA (2 - 4  $\mu\text{mol/L}$ ; Konzentration, die eine 20% Inhibition der Kollagen induzierte Aggregation bewirkt) versetzt. Nach einer weiteren Minute wurde die Aggregation mit Kollagen induziert. Kontrollexperimente mit Kollagen allein wurden nach jeder zweiten bis dritten Messung durchgeführt. Die Ergebnisse werden als % Aggregation relativ zu der durch Kollagen induzierten Aggregation (100 %) dargestellt (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler). In den Abbildungen sind die Endkonzentrationen im Aggregationsgefäß angegeben. Bei Experimenten mit anderen thiol- und nichtthiolhaltigen Substanzen ( N-Acetyl-L-cystein , Ascorbinsäure, DL-Homocystein, Taurin, L-Cystein) wurde analog zu den Versuchen mit reduziertem Glutathion primär mit diesen Substanzen vorinkubiert.

Die Figur 3a zeigt die dosisabhängige Potenzierung der Inhibierung der Kollagen induzierten Thrombozytenaggregation durch S-NO-HSA (2- 4  $\mu\text{mol/L}$ ) mit reduziertem Glutathion ( $n=6$ ;  $*P < 0.05$  versus S-NO-HSA).

Die Figur 3b zeigt die Wirkung von N-Acetylcystein (1 mmol/L), Ascorbinsäure (Vit.C; 200  $\mu$ mol/L), reduziertes Glutathion, Homocystein, Taurin und Cystein (alle 1 mmol/L) auf die Inhibierung der Kollagen induzierten Thrombozytenaggregation durch S-NO-HSA (2- 4  $\mu$ mol/L)  $n \geq 5$  (Taurin,  $n=3$ ); \* $P < 0.01$  versus S-NO-HSA.

Patentansprüche:

1. Pharmazeutisches Kombinationspräparat enthaltend ein therapeutisches Protein mit SH-Gruppen, die nitrosiert sind, und eine Thiolgruppen-hältige Verbindung mit einem mittleren Molekulargewicht von maximal 10.000.
2. Pharmazeutisches Kombinationspräparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens 90% der vorhandenen SH-Gruppen nitrosiert sind.
3. Pharmazeutisches Kombinationspräparat nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als therapeutisches Protein mit nitrosierten SH-Gruppen S-Nitroso-Albumin, S-Nitroso-Orosomucoid, S-Nitroso-Plasminogen-Aktivator, S-Nitroso-Fibrinogen, S-Nitroso-Lys-Plasminogen oder S-Nitroso-Hämoglobin enthalten ist.
4. Pharmazeutisches Kombinationspräparat nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Thiolgruppen-hältige Verbindung reduziertes Glutathion, L-Cystein, N-Acetyl-Cystein, L-Cysteinylglycin,  $\gamma$ -Glutamylcystein, Penicillamin, Penicillamid, N-Acetyl-Penicillamin, N-Acetyl-Penicillamid, Homocystein, Captopril, Dehydroliponsäure und/oder deren oxidierte Form, die nach Verabreichung in vivo reduziert wird, enthalten ist.
5. Pharmazeutisches Kombinationspräparat nach einem der Ansprüche 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass als therapeutisches Protein mit nitrosierten SH-Gruppen S-Nitroso-Albumin und als Thiolgruppen-hältige Verbindung reduziertes Glutathion enthalten ist.
6. Pharmazeutisches Kombinationspräparat nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Thiolgruppen-hältige Verbindung ein in menschlichem Blut und Gewebe vorkommende Verbindung, insbesondere reduziertes Glutathion, L-Cystein, L-Cysteinylglycin,  $\gamma$ -Glutamylcystein oder Dehydroliponsäure, enthalten ist.



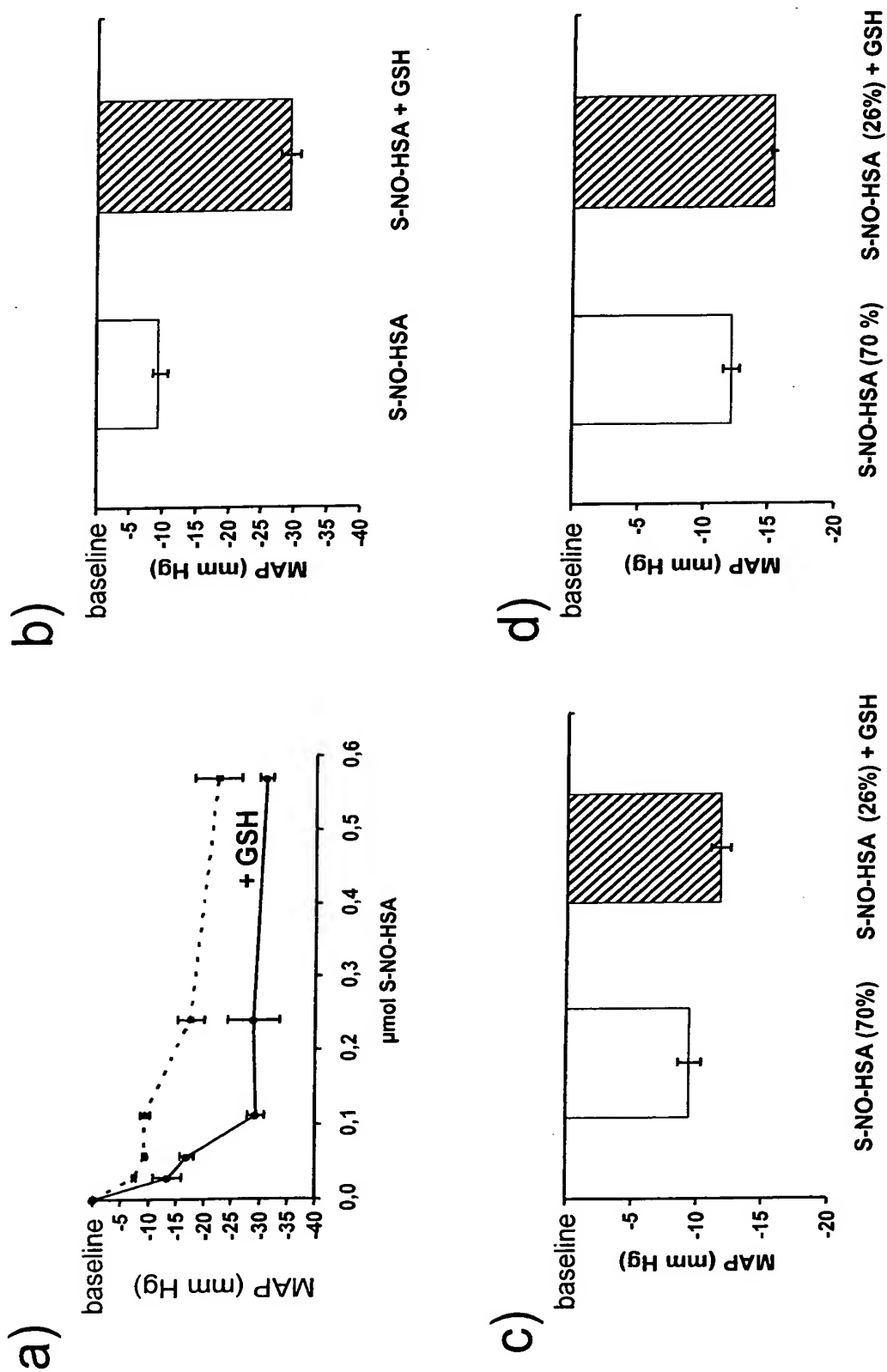
7. Pharmazeutisches Kombinationspräparat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass ein durch Nitrosierung erhaltenes therapeutisches Protein enthalten ist, bei welchem sich der Nitrosierungsgrad zu mindestens 90% aus S-Nitrosierung und zu maximal 10% aus N,O,C-Nitrosierung zusammensetzt.

0910399

## Zusammenfassung

Pharmazeutisches Kombinationspräparat enthaltend ein therapeutisches Protein mit SH-Gruppen, die nitrosiert sind, und eine Thiolgruppen-hältige Verbindung mit einem mittleren Molekulargewicht von maximal 10.000.





BOLUS INJEKTIONEN VON 0,1  $\mu\text{mol/kg}$  S-NO-HSA +  
GSH ( $\mu\text{mol/kg}$ ) – *in vivo*

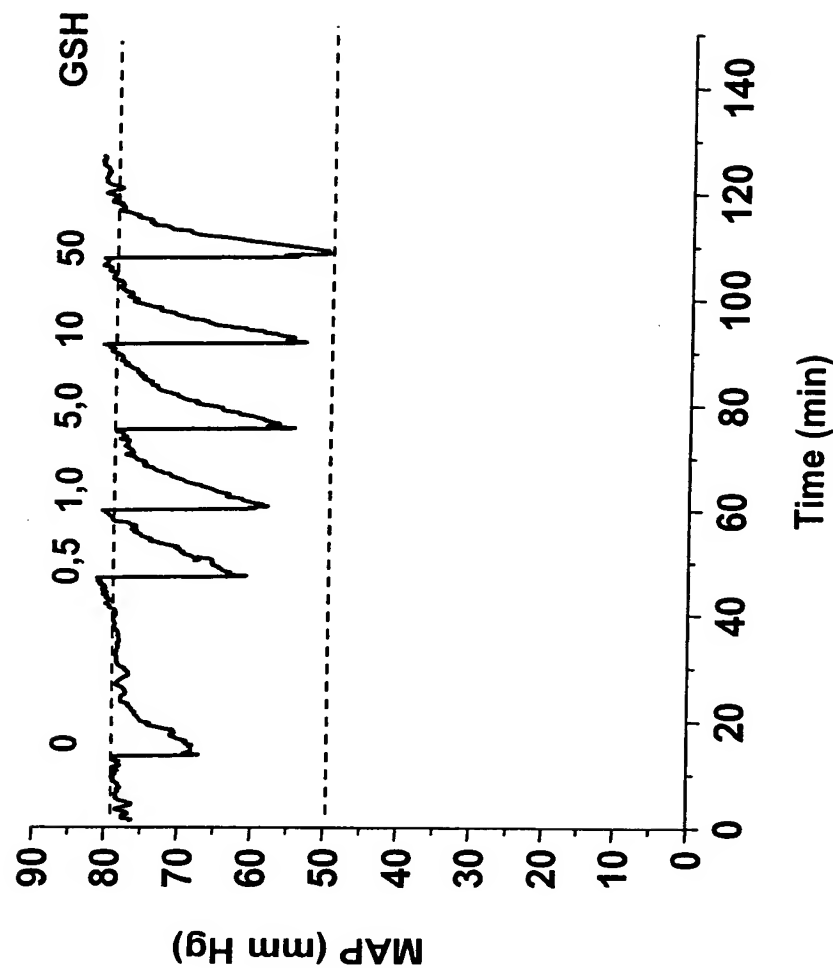


Fig. 1e

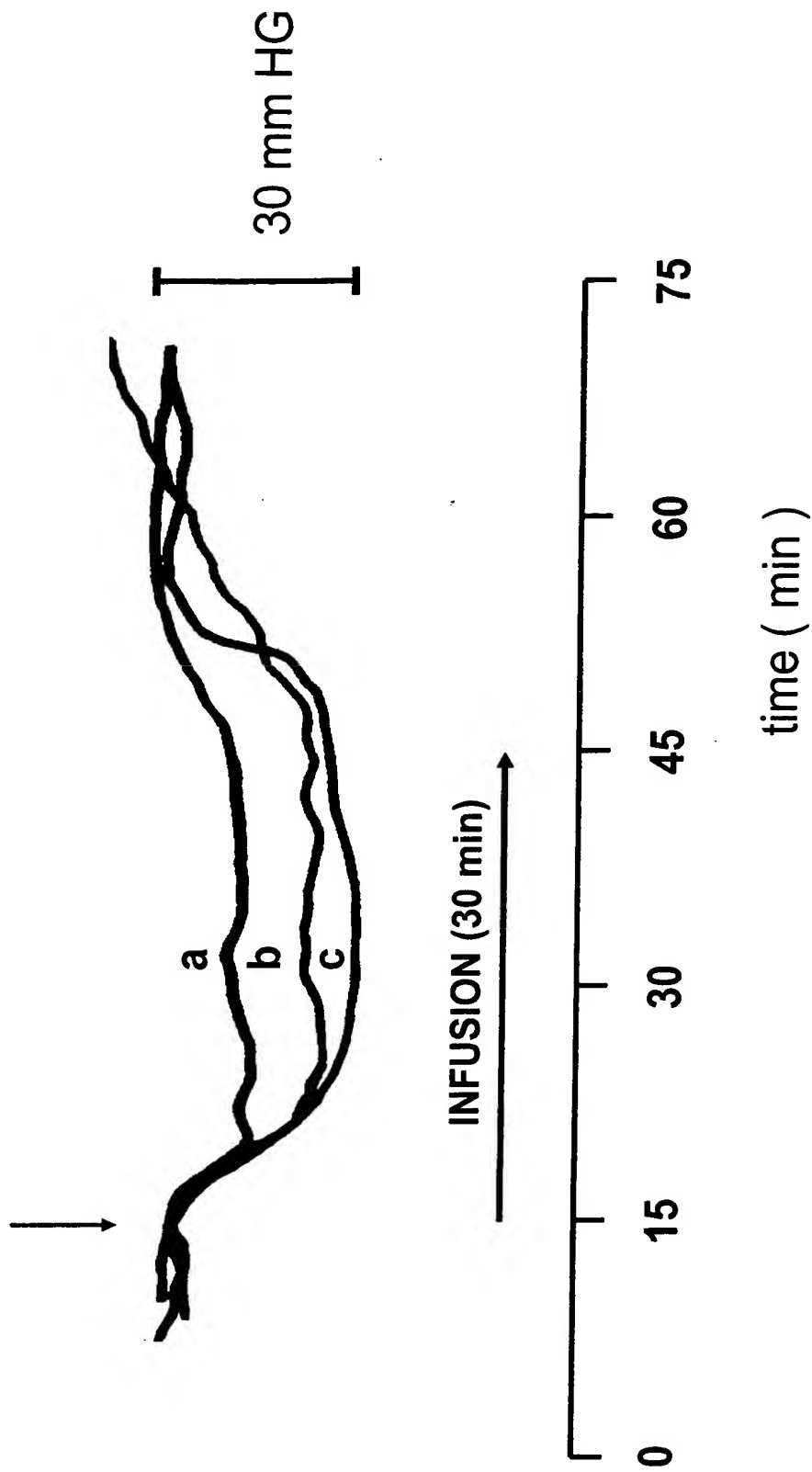


Fig. 1f

Fig. 2a

# Potenzierung der NO Freisetzung von S-NO-HSA durch GSH

(In vitro; phsiol. NaCl, pH=6.5)

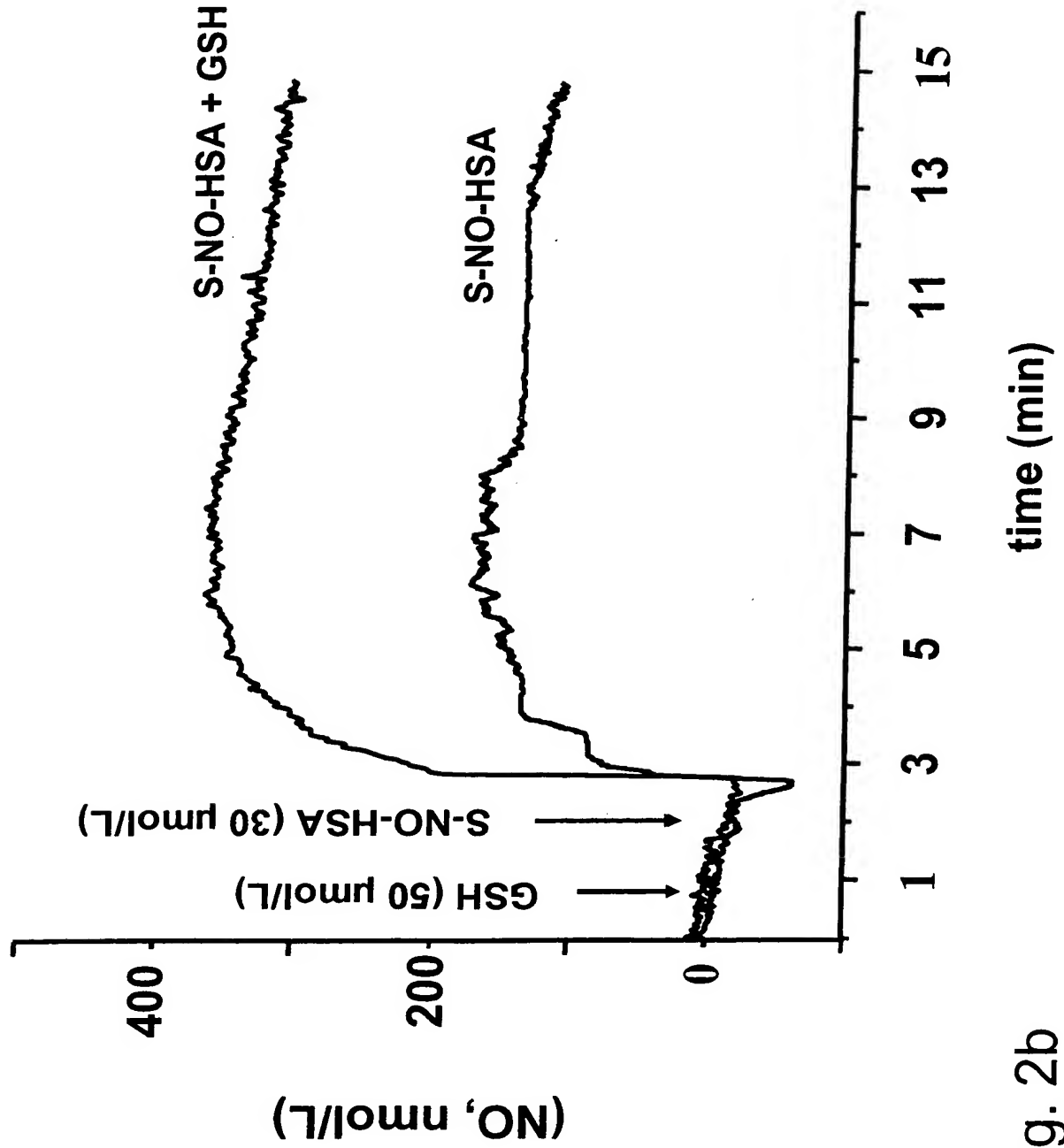


Fig. 2b

Dosisabhängige Potenzierung der Inhibierung der  
Kollagen induzierten Thrombozytenaggregation durch  
S-NO-HSA (2-4  $\mu\text{mol/L}$ ) mit reduziertem Glutathion

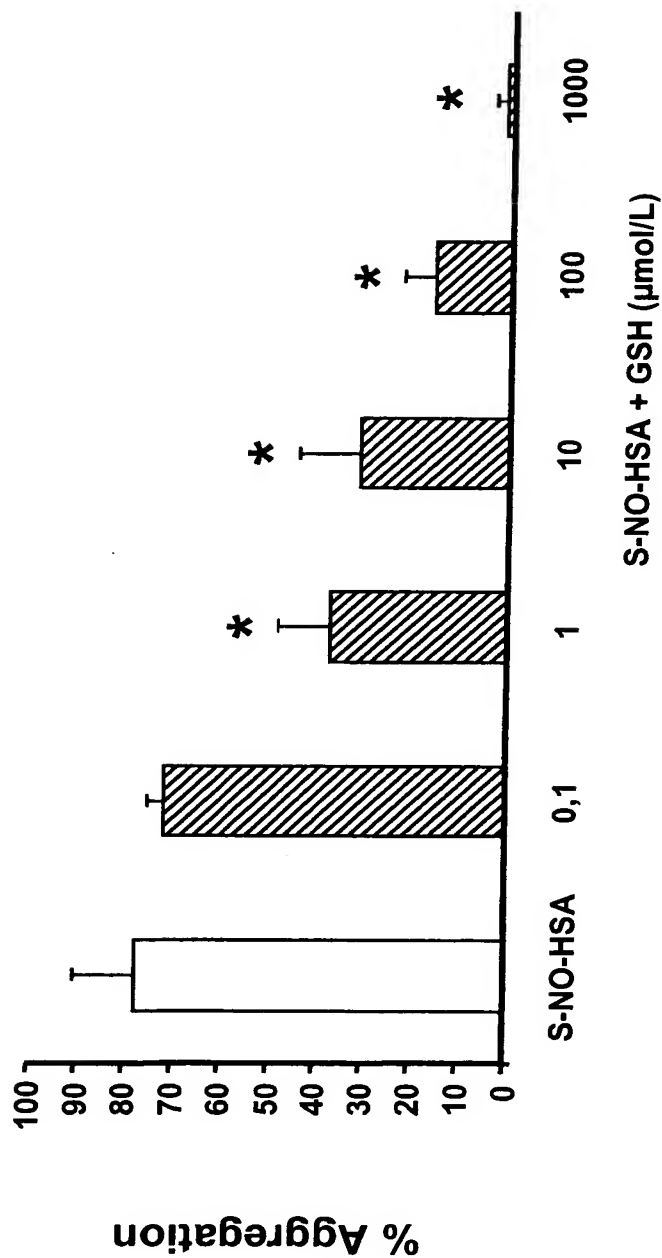


Fig. 3a

Wirkung von N-Acetylcystein (1 mmol/L), Ascorbinsäure (Vit.C; 200  $\mu$ mol/L), reduziertes Glutathion, Homocystein, Taurin und Cystein (alle 1 mmol/L) auf die Inhibierung der Kollagen induzierten Thrombozytenaggregation durch S-NO-HSA (2-4  $\mu$ mol/L)

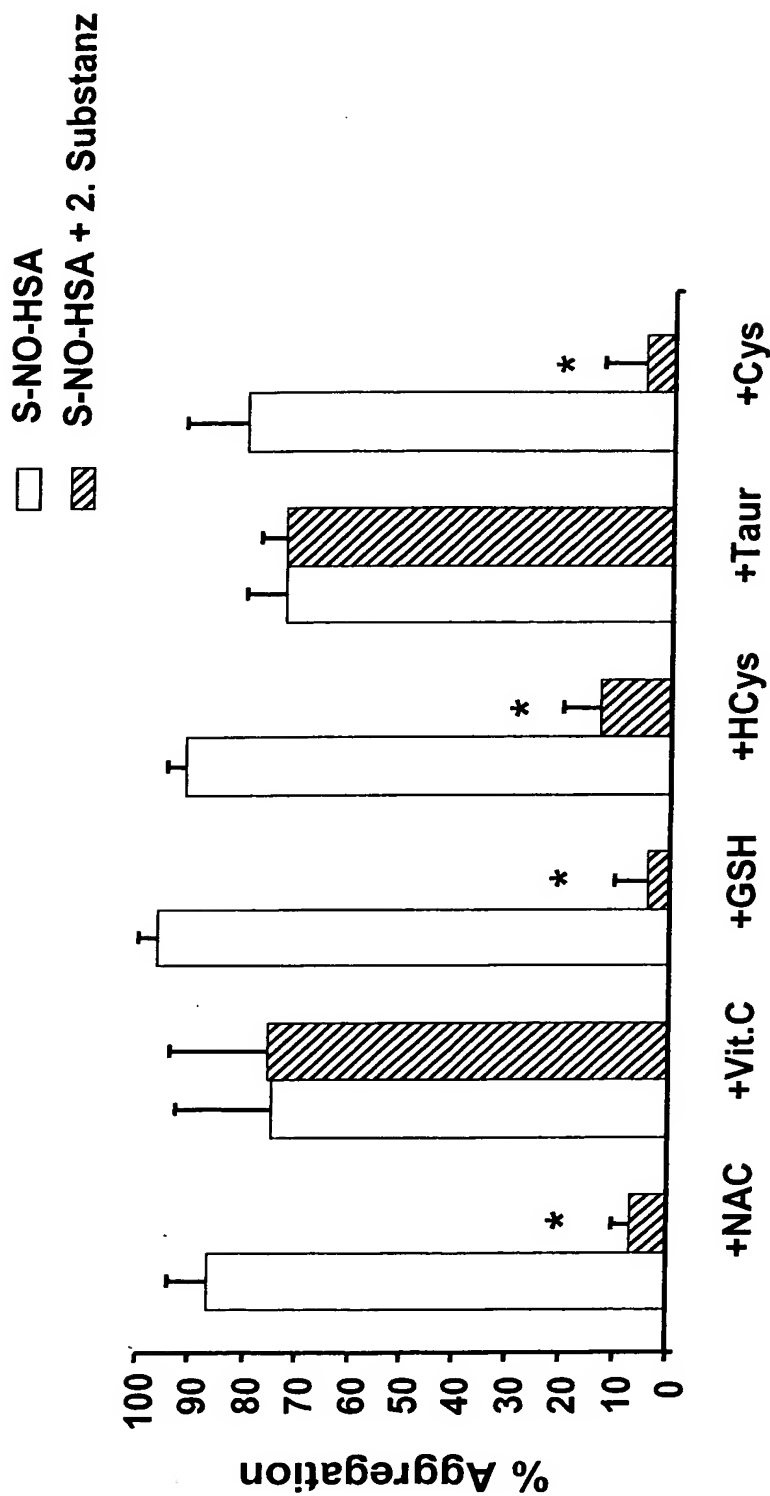


Fig. 3b

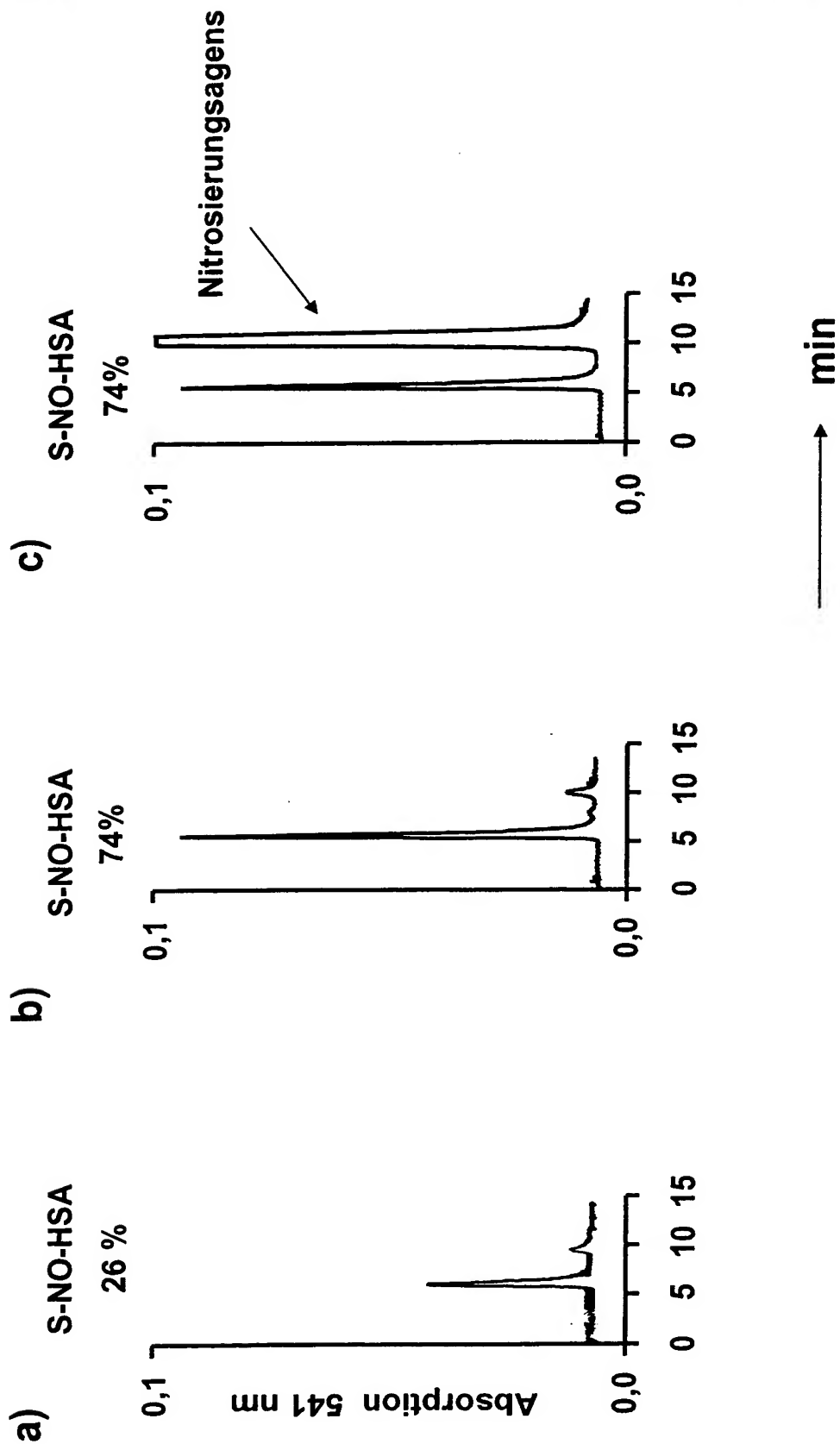


FIG. 4



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**